

審査の結果の要旨

氏名 中村 敦子

Hippo 経路は細胞の接触阻止や器官サイズの制御を担い、その機能不全は腫瘍の発生及び進展に関与する。しかし、哺乳類細胞における細胞接着と Hippo 経路の活性化とをつなぐ分子機構の詳細は明らかにされていない。そこで本研究では、哺乳類細胞における細胞接着シグナルを Hippo 経路活性化へとつなぐ分子経路を明らかにする目的で、肺腺がんにおける細胞接着分子 Cell adhesion molecule 1 (CADM1) の Hippo 経路への関与について検討した。

1. 高密度培養下の非小細胞肺癌細胞における CADM1 による Hippo 経路の活性化

非小細胞肺癌における CADM1 の Hippo 経路への関与を明らかにするために、肺腺がん細胞株 HCC827 において、レンチウイルスを用いて CADM1 安定発現株を作成した。ウェスタンブロット法により Hippo 経路構成分子の発現及びリン酸化を検討した結果、低密度及び高密度の培養条件において YAP1 及び LATS1/2 の発現は変化しなかったが、高密度培養条件下の CADM1 発現株においてのみ、YAP1 のリン酸化が亢進した。したがって、CADM1 は隣接細胞間のトランス・ホモフィリック結合を介して YAP1 のリン酸化を亢進することが予想された。

YAP1 はリン酸化されると細胞質へ局在が移行して転写共役因子としての機能を失う。そこで、CADM1 が YAP1 の転写活性化能に及ぼす影響を明らかにするために、YAP1 の標的遺伝子である *ANKRD1* (Ankyrin repeat domain 1) 及び *CYR61/CCN1* の mRNA の発現を qRT-PCR により検討した。その結果、高密度培養条件下の CADM1 発現株において *ANKRD1* 及び *CYR61* 発現が有意に減少した。従って、CADM1 は飽和細胞密度状態で YAP1 のリン酸化を亢進し、YAP1 の転写活性化能を低下させることが示唆された。

2. CADM1 と相互作用する Hippo 経路構成因子の検討

次に、CADM1 が YAP1 を制御する分子機構を明らかにするために、CADM1

と相互作用し得る Hippo 経路構成因子について検討した。V5 タグを付加した Hippo 経路構成分子を 293FT 細胞に一過的に発現させ、抗 CADM1 抗体を用いて免疫沈降を行った。その結果、抗 V5 タグ抗体を用いたウェスタンブロット法により、14-3-3 η 、AMOTL1、KIBRA、LATS1/2、MST1/2、Merlin と CADM1 との共沈を認めた。このことから、CADM1 が細胞膜直下においてこれらの裏打ちタンパク質群と複合体を形成することで LATS を細胞膜へとリクルートし、Hippo 経路を制御している可能性が示唆された。

3. 非小細胞肺癌における CADM1、LATS2、YAP1 の発現の免疫組織化学的解析

TCGA データベース解析によって肺腺がんにおける予後との相関が報告されている LATS2 は YAP1 を直接的に制御するキナーゼであり、共免疫沈降法により CADM1 との複合体形成を認めたことから、CADM1 及び LATS2 について肺腺がんの免疫組織化学的検討を行った。低悪性度症例では CADM1 と LATS2 は主に細胞膜に局在を認め、CADM1 及び LATS2 を発現する症例は予後良好であった。さらに、CADM1 陽性群と陰性群とに区分して、LATS2 細胞内局在と予後について生存分析を行った。CADM1 陰性症例では LATS2 の細胞内局在の違いによる生存率に差を認めないが、CADM1 陽性症例では LATS2 細胞膜陽性症例は、細胞質陽性症例及び陰性症例に比べて有意に生存率が高く、CADM1 と LATS2 との相互作用が肺腺がんにおける腫瘍抑制に重要であることが示唆された。

抗 YAP1 抗体を用いた肺腺がんの免疫組織染色では、低悪性度症例は高悪性度症例に比べて YAP1 の核局在が有意に高頻度に見られたが、YAP1 が核に局在する高悪性度症例も見られた。しかし、生存期間解析では核内 YAP1 陽性症例と陰性症例との予後に有意な差を認めなかった。さらに CADM1 または LATS2 を陽性群と陰性群とに区分して核内 YAP1 と予後について生存期間解析を行った。特に LATS2 陰性症例では核内 YAP1 は予後不良と相関したことから、CADM1、LATS2 による制御が失われると、核局在の YAP1 は悪性化に寄与することが示唆された。

以上、本論文においてがん抑制タンパク質 CADM1 は、Hippo 経路を介して、細胞接着刺激を Hippo 経路に伝達し、細胞増殖の接触阻止に関わる細胞膜分子として機能することが示唆され、その欠如は、がん細胞の増殖を促進すると考えられる。なお、本論文は論文提出者が主体となって分析及び検証を行ったものであり、博士 (医科学) の学位を授与できると認める。

以上 1999 字